This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional
SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes[5] : C12N 9/22, A61K 37/54

A1

(11) Número de publicación internacional: WO 93/24620

(43) Fecha de publicación internacional: 9 de diciembre de 1993 (09.12.93)

(21) Solicitud internacional: PCT/ES93/00045

(22) Fecha de presentación internacional: 28 de mayo de 1993 (28.05.93)

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 9201164 28 de mayo de 1992 (28.05.92) ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: UNIVERSIDAD DE VALLADOLID [ES/ES]; Pl. Santa Cruz, 8, E-47002 Valladolid (ES).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/solicitantes *(sólo US)* : GIRBES JUAN, Tomás [ES/ES]; José Garrote Tobar, 3-7ºB, E-47014 Valladolid (ES). ROJO RODRIGUEZ, Mª Angeles [ES/ES]; Navarra, 35, E-34003 Palencia (ES). ARIAS VALLEJO, Francisco, Javier [ES/ES]; San Pedro, 4-7ºC, E-47011 Valladolid (ES). FERRERAS RODRIGUEZ, José, Miguel [ES/ES]; Nicolás Salmerón, 13-2ºC, E-47004 Valladolid (ES). MENDEZ PORLAN, Enrique [ES/ES]; Avda. Lomas de Rey, 1, E-28700 San Sebastian de los Reyes (ES). IGLESIAS ALVAREZ, Rosario [ES/ES]; Nicolás Salmerón, 13-2ºC, E-47004 Valladolid (ES).

(74) Mandatario: UNGRIA LOPEZ, Javier; Ungria Patentes y Marcas, S.A., Avda. Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(81) Estados designados: CA, DE, GB, JP, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publicada
Con informe de búsqueda internacional.
Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING RIBOSOMAL RNA RIBONUCLEASE WITH AN ACTIVITY INHIBITING THE PROTEINIC BIOSYNTHESIS FROM SEEDS OF CUCUMIS SATIVUS L., AND UTILIZATION THEREOF

(54) Titulo: METODO DE OBTENCION DE RIBONUCLEASA DE RNA RIBOSOMICO CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE BIOSINTESIS PROTEICA A PARTIR DE SEMILLAS DE CUCUMIS SATIVUS L. Y SU UTILIZACION

(57) Abstract

It has been possible to obtain from the seeds of the plant Cucumis sativus L. a protein which behaves like a catalytic inhibitor of the biosynthesis of proteins both of procaryotic and eucaryotic systems. The protein that we have named cusativin has been obtained and purified to electrophoretic homogeneity through the following steps: a) obtaining saline extracts from seeds; b) obtaining acidifyed extracts from the prior extracts; c) chromatography through S Sepharose Fast Flow (Pharmacia-LKB); d) ultrafiltration through membrane YM-10 of Amicon; e) chromatography through Sephadex G 75 (Pharmacia-LKB); f) chromatography through CM Sepharose Fast Flow; g) ultracentrifugation through membrane YM-10 of Amicon; h) chromatography through Superdex 75-F.P.L.C. (Pharmacia-LKB); i) dialysis; j) chromatography through Mono-S (F.P.L.C., Pharmacia-LKB); k) dialysis and lyophilization of the resultant protein.

(57) Resumen

De las semillas de la planta Cucumis sativus L. se ha obtenido una proteína que se comporta como inhibidor catalítico de la biosintesis de proteínas tanto de sistemas procariontes como eucariontes. La proteína que denominamos cusativina se ha obtenido y purificado hasta homogeneidad electroforética mediante los siguientes pasos: a) obtención de extractos salinos a partir de semillas; b) obtención de extractos acidificados a partir de los extractos anteriores; c) cromatografía a través de S Sepharose Fast Flow (Pharmacia-LKB); d) ultrafiltración a través de membrana YM-10 de Amicón; e) cromatografía a través de Sephadex G 75 (Pharmacia-LKB); f) cromatografía a través de CM Sepharose Fast Flow; g) ultracentrifugación a través de membrana YM-10 de Amicón; h) cromatografía a través de Superdex 75-F.P.L.C. (Pharmacia-LKB); i) diálisis; j) cromatografía a través de Mono-S (F.P.L.C., Pharmacia-LKB); k) diálisis y liofilización de la proteína resultante.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AT	Austria
AU	Australia
BB	Barbados
BE	Bélgica
BF	Burkina Faso
BG	Bulgaria
BJ	Benin
BR	Brasil
CA	Canadá
CF	República Centroafricana
CG	Congo
CH	Suiza
CI	Côte d'Ivoire
CM	Camerún
CS	Checoslovaquia
CZ	República Checa
DE	Alemania
DK	Dinamarca
ES	España
FI	Finlandia
FR	Francia
GA	Gabón
GB	Reino Unido
GN	Guinea
GR	Grecia
HU	Hungría
IE	Irlanda
IT	Italia
JP	Japón
KP	República Popular Democrática de Corea
KR	República de Corea
LI	Liechtenstein
LK	Sri Lanka
LU	Luxemburgo
MC	Mónaco
MG	Madagascar
ML	Mali
MN	Mongolia
MR	Mauritania
MW	Malawi
NL	Países Bajos
NO	Noruega
NZ	Nueva Zelandia
PL	Polonia
PT	Portugal
RO	Rumania
RU	Federación de Rusia
SD	Sudán
SE	Suecia
SK	República Eslovaca
SN	Senegal
SU	Unión Soviética
TD	Chad
TG	Togo
UA	Ucrania
US	Estados Unidos de América

DESCRIPCION

Titulo

METODO DE OBTENCION DE RIBONUCLEASA DE RNA RIBOSOMICO CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE BIOSINTESIS PROTEICA A PARTIR DE SEMILLAS DE CUCUMIS SATIVUS L. Y SU UTILIZACION.

Sector técnico

Bioquímica, Biología Molecular

Estado de la técnica

La presente invención se refiere a la obtención y uso como inactivador de ácido ribonucléico y en particular el de tipo ribosómico que provoca la inhibición de la biosíntesis de proteínas, de una proteína presente en las semillas de Cucumis sativus L. En el reino vegetal existen algunas especies que contienen actividades inhibidoras de la biosíntesis de proteínas en sistemas derivados de organismos eucariontes y procariontes, son de naturaleza protéica e incluyen RNAasas y N-glicosidadas y se conocen colectivamente con el nombre de proteínas inactivadoras de ribosomas (Gasperi-Campani y cols. Biochem.J. 186,439-441 [1980] ; Gasperi-Campani y cols. J.Nat.Prod.48,446-454 [1985]; Ferreras y cols. Cell.Mol.Biol.35,89-95 [1989]; Merino y cols. J.Exp.Bot. 41,67-70 [1990]; Olson y Goerner U.S.Patent 3 230 153; Veldman y cols. Nucleic Acid Res. 9,6935-6952 [1981]; Fando y cols. Eur.J.Biochem. 149,29-34 [1985]). Estas proteínas tienen una masa molecular (Mr) entre 16000 y 33000, son de naturaleza básica e impiden el funcionamiento ribosómico de manera catalítica por

inactivación del ácido ribonucléico (Jimenez y Vázquez, Annu.Rev.Microbiol. 39,649-672 [1985]; Roberts y Selitrennikoff, Biosc.Rep.6,19-29 [1986]; Stirpe y Barbieri, FEBS Lett.195,1-8 [1986]; Endo y Tsurugi, J.Biol.Chem.262,8128-8130 [1987]; Stirpe y cols. Nucleic Acid Res.16,1349-1357 [1988]; Veldman y cols. Nucleic Acid Res. 9,6935-6952 [1981]). El papel biológico de estas toxinas en la planta que las produce es totalmente desconocido (Roberts y Selitrennikoff Biosc.Rep.6,19-29 [1986]). Estas proteínas son inmunológica y químicamente diferentes unas de otras aunque guardan alguna homologia secuencial en los aminoácidos del extremo amino-terminal en particular cuando las toxinas pertenecen a la misma familia taxonómica (Montecucchi y cols. Int.J.Peptide Protein Res.33,263-267 [1989]). Su enorme interés reside en que se utilizan en la construcción de inmunotoxinas para terapia del **cáncer** (Vitetta y Uhr, Annu.Rev.Immunol.3,197-212 [1985]; Frankel y cols. Annu.Rev.Med.37,125-142 [1986]; Koppel,Bioconj.Chem.1,13-23 [1990]; Lord, Plant Physiol.85,1-3 [1987]) y del **síndrome de inmunodeficiencia adquirida** (Till y cols. Science 242,1166-1168 [1988]; Ghetie y cols. Bioconj.Chem.1,24-31 [1990]). Muy recientemente se ha encontrado que diversas N-glicosidasas de este grupo y en particular la llamada tricosantina poseen **per se** carácter inactivador del virus RNA HIV-1 que es el agente etiológico del síndrome de inmunodefiencia adquirida (McGrath y cols. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,2844-2848 [1989]; Lee-Huang y cols. FEBS Lett.272,12-18 [1990]; Lee-Huang y cols. Proc.Natl.Acad Sci.USA 88,6570-6574 [1991]; Zarling y cols. Nature 347,92-95 [1990]). Por otro lado se sabe desde hace tiempo que las RNAasas α-sarcina, mitogillina y restrictocina poseen carácter antitumoral frente a sarcoma 180, adenocarcinoma 755 y leucemia 1210 (Olson y Goerner U.S.Patent 3 230 153; Olson y cols. Appl. Microbiol.13,322-326 [1965]; Roga y cols. Cancer Chemother. Rep.Part 1 55,101-113 [1971]). Dado que las proteínas son substancias antigénicas poderosas, para poder abordar

cualquier tipo de terapia con ellas es necesario disponer de una bateria de dichas toxinas lo más ámplia posible con el objeto de seleccionar la menos inmunoreactiva por un lado y de poder substituir la toxina o la parte tóxica de la inmunotoxina según se van desarrollando anticuerpos neutralizantes en el paciente, por otro lado. Además no todas estas toxinas protéicas poseen la misma citotoxicidad (Lee-Huang y cols. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88,6570-6574 [1991]).

Explicación de la invención

La presente invención consiste en la obtención de una proteína que en base a sus propiedades químico-físicas, inmunogénicas y bioquímicas se pueden clasificar en el grupo de proteínas vegetales inactivadoras de ribosomas. Esta proteína degrada catalíticamente el ácido ribonucléico (RNA) y provoca la inhibición de la biosíntesis de proteínas en sistemas derivados de bacterias y organismos eucariontes, mamíferos y plantas. Sus aplicaciones más importantes son: como inhibidor de biosíntesis de proteínas en sistemas in vitro, como inhibidor de biosíntesis de proteínas en células permeabilizadas como consecuencia de la infección de un virus animal, como inhibidor en células y tejidos acoplada a anticuerpos monoclonales específicos de dichas células y tejidos y como potencial antiviral contra virus RNA.

Modos de realizar la invención

Los varios aspectos de la invención se describen con el siguiente ejemplo que no intenta limitar en algun modo la invención. El ejemplo se desglosa en tres partes: **a) obtención de cusativina a partir de Cucumis sativus L.; b) caracterización quimico-física, composición de aminoacidos, obtención de péptidos trípticos; secuencia de aminoácidos de algunos péptidos trípticos, desarrollo de anticuerpos policlonales en conejo y actividad RNAasa del RNA ribosómico ; c) inhibición de la biosíntesis de proteínas.**

a) obtención de cusativina

500 g de semillas secas de Cucumis sativus L. se trituraron en un molinillo hasta conseguir un polvo fino que se extrajeron con 4 l de solución 140 mM cloruro sódico y 5 mM fosfato monosódico (pH 7,2) a 4°C durante 12 h. La pasta resultante se filtró a través de malla para queso para eliminar los sólidos remanentes. El extracto líquido se acidificó a pH 4 con ácido acético glacial y los sólidos que aparecieron se eliminaron por centrifugación a 10000 x g durante 45 min a 0°C. El fluido sobrenadante (2770 ml) se filtró a través de un lecho cromatográfico de 5 cm de diámetro y 0,5 cm de altura de Sephadex G-25. El fluido filtrado se sometió a cromatografía de intercambio iónico en S Sepharose Fast Flow (columna de 5 x 12,7 cm). La solución de equilibrado de columna fué acetato sódico 10 mM (pH 4,5). El fluido protéico acidificado se aplicó a la columna. La parte no retenida a la columna se desechó. A continuación la columna se lavó con solución de acetato sódico 10 mM (pH 4,5) hasta que la absorbancia a 280 nm se redujo al mínimo. A continuación se lavó la columna con solución de fosfato monosódico 5 mM (pH 7). Los dos lavados se desecharon. Por último la columna se eluyó con solución 1 M de cloruro sódico y 5 mM de fosfato monosódico (pH 7). La proteina eluida en 465 mL se sometió a ultrafiltración a través de membrana YM-10

de Amicón. El concentrado protéico se sometió a cromatografía en Sephadex G 75 en columna de 5 x 90 cm, preequilibrada y eluida con solución de fosfato monosódico 5 mM (pH 7). Todas las fracciones (600 mL) conteniendo actividad inhibidora de biosíntesis de proteínas en un sistema de hígado de rata se recogieron y se juntaron. Esta preparación protéica se sometió a continuación a cromatografía de intercambio iónico en gradiente de fuerza iónica en CM-Sepharose Fast Flow (columna de 2,5 x 8 cm), preequilibrada con solución 5 mM fosfato monosódico (pH 7). Primero se fijó la proteína y después se aplicó el gradiente iónico consistente en 0,775 L de solución 5 mM de fosfato monosódico (pH 7) y 0,775 L de solución 400 mM de cloruro sódico. La velocidad se ajustó a 7 mL por min. y se recogieron fracciones de 10 mL. Las fracciones (162 mL) conteniendo actividad inhibidora de biosíntesis de proteínas se recogieron y se concentraron por ultrafiltración con membrana YM-10 de Amicon. La solución resultante se cromatografió en columna Superdex 75-FPLC equilibrada y eluída con solución de 400 mM NaCl y 5 mM fosfato monosódico (pH 7). El segundo pico eluído era cusativina. La proteína contenida en dicho pico se dializó extensivamente frente fosfato monosódico 5mM (pH 7). La solución se sometió después a cromatografía en columna Mono S- FPLC equilibrada con solución 5 mM fosfato monosódico (pH 7). La columna se eluyó con un gradiente de 50 ml de 100 mM NaCl y 5 mM fosfato monosódico (pH 7) y 50 ml de 300 mM NaCl y 5 mM fosfato monosódico (pH 7). El primer pico de proteína eluído (el mayoritario) se dializó frente a agua (Milli Q de Millipore) y se liofilizó.

b) caracterización quimico-física, composición, péptidos trípticos, secuencia aminoacidica de diversos péptidos, actividad RNAásica del RNA ribosomico y actividad inmunogénica de cusativina.

- Caracterización quimico-física

La masa molecular relativa (Mr) se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida (15 % acrilamida y 2,7 % bis-acrilamida) por el procedimiento de Laemmly (Nature 227, 680-685 [1970]). Se utilizaron como proteínas patrón las siguientes:

albúmina sérica bovina (68000), L-glutamato deshidrogenasa (54400), alcohol deshidrogenasa (37000), anhidrasa carbónica (29000) e inhibidor de tripsina (20100).

La Mr obtenida fué 22000.

Cusativina no posee cadenas glucídicas reactivas con el sistema de detección de glicanos de Boehringer (Glycan Detection Kit, Boehringer Mannheim).

La termoestabilidad de la cusativina se determinó por calentamiento de la proteína a distintas temperaturas en ausencia o presencia de glicerol o trehalosa. La proteína es termosensible, inactivandose parcialmente a partir de los 60°C y totalmente a 95°C durante 20 min.

- Composición, péptidos trípticos y secuencia aminoacídica de algunos péptidos

La composición de aminoácidos determinada por hidrólisis ácida de las proteínas y análisis cromatográfico de los aminoacidos resultantes se realizó por técnicas standard descritas en la literatura (Barber y cols. Planta 176,221-229 [1988]). La proteina se hidrolizó con 5.7 M de ácido clorhídrico conteniendo 0,05 % (v/v) de mercaptoetanol en tubos sellados al vacio durante 24 h. Los análisis se realizaron con un equipo Beckman 6300 equipado con un integrador CR3A Shimadzu).

Los valores se relacionan en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de aminoacidos de la cusativina

Aminoácido	Cusativina (residuos)
Cys	N.D.
Asp	23
Thr	13
Ser	10
Glu	18
Pro	14
Gly	17
Ala	12
Met	4
Ile	10
Leu	13
Tyr	4
Phe	13
Lys	15
His	6
Arg	11
Trp	N.D.

Se admite un error de ± 2 restos.

N.D. no determinado

La digestión de cusativina con tripsina 1,5 % (p/p) durante 4 h a 37°C rindió una colección

de péptidos que pudieron ser resueltos por cromatografía en H.P.L.C. con columna C_{18} Nova Pak de fase reversa. El patrón de dichos péptidos en estas condiciones es el mostrado en la figura 1.

Figura 1. Perfil de los péptidos trípticos de la cusativina.

La cromatografía se realizó con gradiente agua-acetonitrilo. A: 0,1 % (v/v) trifluoroacético; B: acetonitrilo con 0,1 % (v/v) trifluoroacético. Elución: 5 min de A y después gradiente de 0-40% de B.

La secuencia aminoacídica de diversos péptidos trípticos de la cuativina se determinó, como se indica en Limas y cols.(Planta 181,1-9 [1990]), con un secuenciador de proteinas Knauer modelo 810 equipado con un analizador de PTH-aminoácidos (feniltiohidantoilderivados de los aminoacidos). Las secuencias se determinaron en presencia de polibreno. Las secuencias son las indicadas en la figura 2.

Figura 2. Secuencias de algunos péptidos trípticos de la cusativina.

Péptido Nº 21: I-A-H-L-E-N-D-L-N-V-V-W-P-N-V-V-T-I-N-N-K

Péptido Nº 19: S-F-T-H-G-L-W-P-N-K

Péptido Nº 18: P-P-X-G-H-E-X-N-K

Péptido Nº 13: Y-F-Q-T-A-I-N-M-R

Péptido Nº 31: A-S-N-G-Q-V-L-L-T-E-I-V-M-X-F-D-D-D-X-X-T-L

- Actividad RNAásica de la cusativina

La actividad RNAásica de la cusativina se determinó incubando ribosomas purificados de Lisado de reticulocito de conejo con cantidades variables de la proteína. Después se extrajo el rRNA con fenol (Maniatis y cols. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982) y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida (4,85 % acrilamida y 0,150 % bisacrilamida) y 7 M de Urea. Después se tiñeron los geles con bromuro de etidio. 200 µg de ribosomas purificados de lisados de reticulocitos se incubaron con 10 ng/ml(1), 100 ng/ml(2) o 600 ng/ml(3) de cusativina en solución Tris-ClH 25 mM, KCl 150 mM y $(Ac0)_2$ Mg 8 mM, durante 15 min a 37°C. Después el rRNA se extrajo de estas mezclas de reacción con un volumen de fenol saturado de Tris-ClH 0,1 M, en presencia de 5mM EDTA. La extracción con fenol se realizó otras dos veces y finalmente el rRNA se precipitó con dos volumenes de etanol en solución de acetato de sodio 0,3 M (pH 5,2), a -80°C durante 2 h. El análisis electroforético se realizó como sigue. El precipitado de rRNA se resuspendió en agua, 6µg de rRNA en tampón de electroforesis (100 mg/ml de sacarosa, 7 M de urea, 0,4µ/ml de azul de bromofenol, 89 mM de Tris-ClH, 89 mM de ácido bórico y 2,5 mM de EDTA) se colocaron en cada uno de los pocillos del gel de poliacrilamida (4,85% acrilamida y 0,150% de bisacrilamida preparado según Sandra Sallustio and Pamela Stanley, J.Biol.Chem. 1990, 265, 582-588). La electroforesis se llevó a cabo a 20 mA durante 45 min en un sistema de minigeles (Mighty Small, Hoefer). El teñido del gel se realizó con 0,5 µg/ml bromuro de etidio durante 20 in. La visualización se realizó

con transiluminador de lámpara de U.V. Los resultados de estos experimentos realizados con cusativina y ribosomas de lisados de reticulocitos de conejo indican que cusativina es una potente RNAasa.

- Actividad inmunogénica y especificidad inmunológica de la cusativina

Cusativina posee una fuerte actividad inmunogénica que permite obtener anticuerpos policlonales en conejo por los procedimientos standard (Harlow E.D. y Lane D.: Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 1988)..

Un conejo de 2 kg se inyectó con 0,5 mg de cusativina en emulsión de Freund completa. Las inyecciones se repitieron cada dos semanas con 0,5 mg de cusativina en emulsión incompleta de Freund. Despues de dos meses de la primera inyección los conejos se sangraron y de la sangre se separó el suero. Dicho suero raccionó fuertemente en placas de inmunodifusión de agarosa al 1,4 % con cusativina pero no lo hizo con otras proteinas inactivadoras de ribosomas.

c) inhibición de la biosíntesis de proteinas

Los estudios de inhibición de biosíntesis **in vitro** de proteinas se realizaron utilizando distintos sistemas acelulares en las condiciones standard descritas en las correspondientes referencias bibliográficas.

Tabla 2. Efecto de cusativina sobre la biosíntesis de proteinas llevada a cabo por distintos sistemas acelulares.

Sistema acelular	IC_{50}(ng/ml)	Referencia bibliográfica
Lisados de reticulocitos de conejo	18	1
higado de rata	31	1
gérmen de trigo	75	1
gérmen de Vicia sativa L.	18	2
gérmen de Cucumis sativus L.[a]	198	1
Escherichia coli	125	3

Refs.: 1.Arias y cols; Planta 186, 532-540 [1992]; 2.Arias y cols. Phytochemistry 30, 3185-3187 [1991]; 3.Girbés y cols. Meth. Enzymol. 59, 353-362 [1979].

IC_{50} indica la concentración de proteina que provoca un 50 % de inhibición de biosíntesis de

proteinas en las condiciones standard de cada sistema acelular. Los experimentos se realizaron en las condiciones indicadas en las referencias bibliográficas.

[a] El sistema acelular se obtuvo exactamente como el de Vicia sativa y las condiciones de síntesis fueron las mismas que para Vicia sativa.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención y aislamiento de la proteína cusativina de las semillas de la planta Cucumis sativus L. con actividad RNAásica del ácido ribonucléico ribosómico, de Mr aparente 22000, tipificada por sus propiedades su composición y sus efectos inhibidores. La proteína cusativina aislada de las semillas de la planta Cucumis sativus L. que inhibe la biosíntesis de proteínas y que tiene los péptidos trípticos siguientes:

Péptido Nº 21: I-A-H-L-E-N-D-L-N-V-V-W-P-N-V-V-T-I-N-N-K

Péptido Nº 19: S-F-T-H-G-L-W-P-N-K

Péptido Nº 18: P-P-X-G-H-E-X-N-K

Péptido Nº 13: Y-F-Q-T-A-I-N-M-R

Péptido Nº 31: A-S-N-G-Q-V-L-L-T-E-I-V-M-X-F-D-D-D-X-X-T-L

2. Procedimiento de obtención y aislamiento de la proteína cusativina según reivindiacación 1 utilizada para la inactivación in vitro de ribosomas de bacterias, plantas y de mamíferos.

3. Procedimiento de obtención y aislamiento de la proteína cusativina según reivindiacaciones 1 y 2 utilizada para la inactivación in vitro del ácido ribonucléico ribosómico de bacterias, plantas y mamíferos.

4. Procedimiento de obtención y aislamiento de la proteína cusativina según reivindiacaciones 1, 2 y 3 utilizada para la inhibición de la biosíntesis de proteínas en células animales permeabilizadas por la infección con virus animales.

5. Procedimiento de obtención y aislamiento de la proteína cusativina según reivindiacaciones 1, 2, 3 y 4 utilizada para la construcción de conjugados con otras especies químicas con la finalidad de inhibir la biosíntesis de proteinas por inactivación in vivo de ribosomas de organismos eucariontes.

6. Procedimiento de obtención y aislamiento de la proteína cusativina según reivindiacaciones 1, 2, 3, 4 y 5 utilizada para inhibir la propagación funcional, in vivo y en células intactas aisladas, de ácido ribonucléico en enfermedades provocadas o mantenidas por virus cuyo contenido genético sea ácido ribonucléico.

7. Procedimiento de obtención y aislamiento de la proteína cusativina según reivindiacaciones 1, 2, 3, 4 y 5 utilizada, bien libre bien en forma de conjugados con otras especies quimicas, para inactivar células blanco específicas en seres humanos y animales de experimentación.

8. Procedimiento de obtención y aislamiento de la proteína cusativina según reivindiacaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 utilizando la secuencia interna de aminoácidos para propósitos de clonación molecular del (los) gen(s) que codifican a la cusativina.

9. Procedimiento de obtención y aislamiento de la proteína cusativina según reivindiacaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 utilizándola, modificada químicamente por alquilación y tiolación para cualquiera de los propósitos comtemplados en los puntos anteriores.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 93/00045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC[5] C12N9/22; A61K37/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC[5] C12N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSIS Vol. 125, No. 1, April 1968, pages 86-93 C.I. KADO "Purification and properties of a ribonuclease isolated from etiolated cucumber seedlings" see abstract see page 87, right-hand column, paragraph 3 - page 89, right-hand column, paragraph 1 see page 91, left-hand column, paragraph 3 - page 92, left-hand column, paragraph 3; table II --- ./..	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 September 1993 (21.09.93)	29 September 1993 (29.09.93)
Name and mailing address of the ISA/ EUROPEAN PATENT OFFICE Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 93/00045

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FEBS LETTERS Vol. 284, No. 2, 24 June 1991, AMSTERDAM NL pages 161 - 164 HIROYUKI IDE ET AL. "The complete amino acid sequence of ribonuclease from the seeds of bitter gourd (Momordica charantia)" see abstract; figure 1	1

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional Nº PCT/ES 93/00045

I. CLASIFICACION DE LA INVENCION (caso de ser aplicables varios símbolos de clasificación, indicarlos todos) [6]

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasifación nacional y la CIP

CIP. 5 C12N9/22; A61K37/54

II. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada [7]

Sistema de clasificación	Símbolos de clasificación
CIP. 5	C12N ; A61K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda [8]

III. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES [9]

Categoría *	Identificación de los documentos citados, [11] con indicación, en caso necesario, de los pasajes pertinentes [12]	Nº de las reivindicaciones a las que se refieren [13]
A	ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS vol. 125, núm. 1, Abril 1968, páginas 86 - 93 C.I. KADO 'Purification and properties of a ribonuclease isolated from etiolated cucumber seedlings' ver resumen ver página 87, columna derecha, párrafo 3 - página 89, columna derecha, párrafo 1 ver página 91, columna izquierda, párrafo 3 - página 92, columna izquierda, párrafo 3; tabla II --- -/--	1

* Categorías especiales de documentos citados: [10]

"A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente

"E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de prioridad y que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento particularmente pertinente: la invención reivindicada no puede considerarse como nueva ni que implique una actividad inventiva

"Y" documento particularmente pertinente: la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

IV. CERTIFICACION

Fecha en al que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional	Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional
21 SEPTIEMBRE 1993	29 -09- 1993
Administración encargada de la búsqueda internacional	**Firma del funcionario autorizado**
OFICINA EUROPEA DE PATENTES	MONTERO LOPEZ B.

3

EPO FORM (PCT/ISA/210)

III. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES (CONTINUACION DE LOS DATOS INDICADOS EN LA SEGUNDA HOJA)

Categoría *	Identificación de los documentos citados, con indicación, en caso necesario, de los pasajes pertinentes	Nº de las reivindicaciones a las que se refieran
A	FEBS LETTERS. vol. 284, núm. 2, 24 Junio 1991, AMSTERDAM NL páginas 161 - 164 HIROYUKI IDE ET AL. 'The complete amino acid sequence of ribonuclease from the seeds of bitter gourd (Momordica charantia)' ver resumen; figura 1	1